

Solid phase extraction purification of DNA.

Publication number: JP5268963 (A)

Publication date: 1993-10-19

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: *B01J20/02; C07H1/06; C07H1/08; C12N15/09; C12N15/10; B01J20/02; C07H1/00; C12N15/09; C12N15/10; (IPC1-7): C12N15/10; B01J20/02*


- European: C07H1/06; C07H1/08; C12N15/10A2


Application number: JP19920113578 19920506

Priority number(s): US19910695113 19910503

Also published as:

 JP7051065 (B)

 EP0512767 (A1)

 EP0512767 (B1)

 US5405951 (A)

 SG49924 (A1)

[more >>](#)

Abstract not available for JP 5268963 (A)

Abstract of corresponding document: **EP 0512767 (A1)**

The invention provides a method for purifying DNA from any source in any form. The method comprises the use of water soluble organic solvents when purifying DNA. By using water soluble organic solvents such as ethanol, propanol, and isopropanol, DNA is purified with greater recovery amounts. In addition, the use of water soluble organic solvents eliminates the use of caustic and poisonous compositions such as chaotropes.

~~~~~  
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-268963

(43)公開日 平成 5 年(1993)10月19日

|                          |      |         |                |        |
|--------------------------|------|---------|----------------|--------|
| (51)Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号  | F I            | 技術表示箇所 |
| C 1 2 N 15/10            |      |         |                |        |
| B 0 1 J 20/02            | Z    | 7202-4G |                |        |
|                          |      | 8931-4B | C 1 2 N 15/ 00 | A      |

審査請求 有 請求項の数10(全 9 頁)

(21)出願番号 特願平4-113578

(22)出願日 平成 4 年(1992) 5 月 6 日

(31)優先権主張番号 6 9 5 1 1 3

(32)優先日 1991年 5 月 3 日

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 591007332

ベクトン・ディッキンソン・アンド・カン  
パニー

BECTON DICKINSON AN  
D COMPANY

アメリカ合衆国ニュージャージー州07417  
-1880, フランクリン・レイクス, ワン・  
ベクトン・ドライブ (番地なし)

(72)発明者 ダニエル・エル・ウッダード

アメリカ合衆国ノース・カロライナ州  
27606, ローリー, アヴェント・リッジ・  
ロード 1800 アパートメント 203

(74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外 6 名)

(54)【発明の名称】 DNAの固相抽出精製

(57)【要約】

【目的】 本発明は、あらゆる形態のあらゆる源からD  
NAを精製する方法を提供する。

【構成】 本発明の方法は、DNAの精製において水溶  
性有機溶媒を使用することからなる。水溶性有機溶媒、  
例えばエタノール、プロパノール、およびイソプロパノ  
ールを使用することにより、DNAは高い回収率をもっ  
て精製される。さらに水溶性有機溶媒の使用により、カ  
オトロプのような腐食性かつ有毒な組成物の使用が避け  
られる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 親水性表面に DNA を結合させるために、水溶性有機溶媒を添加することよくなる、溶液から DNA を精製する方法。

【請求項 2】 水溶性有機溶媒が、イソプロパノール、プロパノールおよびエタノールからなる群から選択される溶媒である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 水溶性有機溶媒が、約 1 % ないし約 99 % のエタノール、約 1 % ないし約 99 % のイソプロパノールおよび約 1 % ないし約 99 % のプロパノールからなる群から選択される溶媒である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 親水性表面が、セライト珪そう土、シリカポリマー、珪酸マグネシウム、シリコン窒素化合物、珪酸アルミニウムおよび二酸化珪素からなる群から選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】 親水性表面がセライト珪そう土である、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 下記工程からなる、溶液から DNA を精製する方法：

- (a) 前記溶液に親水性表面を添加し；
- (b) 水溶性有機溶媒を添加し；
- (c) (a) および (b) 工程からの成分を含む DNA 溶液を液体画分と非液体画分に分離し；
- (d) (c) 工程からの非液体画分を洗浄し；
- (e) (d) 工程からの非液体画分から液体画分を分離し；そして
- (f) (e) 工程からの非液体画分から DNA を遊離させる。

【請求項 7】 親水性表面が、セライト珪そう土、シリカポリマー、珪酸マグネシウム、シリコン窒素化合物、珪酸アルミニウムおよび二酸化珪素からなる群から選択される、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】 水溶性有機溶媒が、イソプロパノール、プロパノールおよびエタノールからなる群から選択される溶媒である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 9】 水溶性有機溶媒が、約 1 % ないし約 99 % のイソプロパノール、約 1 % ないし約 99 % のプロパノールおよび約 1 % ないし約 99 % のエタノールからなる群から選択される溶媒である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 10】 さらに溶出バッファーを添加する工程 (g) を含む、請求項 6 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は分子生物学の分野に関する。特に、本発明はデオキシリボ核酸の精製の分野に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 分子生物学および関連する学問分野の絶え間ない進歩は、前進した技術を十分に理解しおよび発展させるために、改良された手段を継続的に必要とす

る。

【0003】 様々な技術に、デオキシリボ核酸 (DNA) を種々の形態で使用することが含まれる。例えば、組換え DNA 技術の領域の進歩は、常に DNA をプローブ、ゲノム DNA、およびプラスミド DNA の形状で用いることを要求する。

【0004】 診断分野の進歩もまた、DNA を種々の方法で用い続けている。例えば、DNA プローブは、ヒトの病原因子の検出および診断に日常的に用いられている。同様に DNA は遺伝疾患の検出に用いられている。DNA はまた食品汚染の検出にも用いられている。さらに、DNA は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の理由により、興味ある DNA の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0005】 多くの場合、DNA は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を浪費する煩雑な操作は DNA の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の DNA の精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0006】 典型的な DNA 精製手法には、腐食性で有毒な組成物の使用が含まれる。典型的な DNA 精製手法は、高濃度のカオトロピック塩 (例えばヨウ化ナトリウムおよび過塩素酸ナトリウム) を使用する。

【0007】 DNA の精製には多くの手法が存在する。DNA 精製分野での最近の活動が示しているように、最適な DNA 精製手法を求めて絶え間無い探究が行われている。米国特許第 4, 923, 978 号に開示されている DNA の精製法では、蛋白質と DNA の溶液を水酸基を持たせた支持体に通過させて蛋白質を結合させ、そして DNA を溶出している。米国特許第 4, 935, 342 号で開示されている DNA の精製法では、DNA を選択的に陰イオン交換体に結合させ、つづいて溶出している。米国特許第 4, 946, 952 号は、水溶性のケトンで沈澱させることよくなる DNA の単離法を開示している。カオトロピック剤を用いた DNA の精製手法および透析された DNA が、米国特許第 4, 900, 677 号に開示されている。

【0008】 現在知られている DNA 精製手法はその目的を達成することが可能であるとは言え、そのような腐食性で有毒な化合物 (例えば最もしばしば用いられるカオトロピック剤) の使用なしに DNA を精製し、かつ増大量の DNA を取得できることが望ましい。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は非腐食性で非毒性の溶媒を用いることよくなる DNA の精製法を提供する。

【0010】 本発明の一態様においては、水溶性有機溶

媒を添加してDNAを親水性表面に結合させることよ  
 なる、溶液からDNAを精製する方法が提供される。

【0011】好ましい態様においては、次の工程からな  
 る溶液からのDNAの精製方法が提供される：

- (a) 親水性表面を溶液に添加する；
- (b) 水溶性有機溶媒を添加する；
- (c) 工程(a) および(b) からのDNA溶液を液体画分と  
 非液体画分に分離する；
- (d) 工程(c) の非液体画分を洗浄する；
- (e) 工程(d) の非液体画分から液体画分を除去する；
- (f) (e) の非液体画分からDNAを遊離させる。

【0012】本発明は、より大量の精製DNAを得るた  
 めに特に有用である。加えて、DNAは任意の親水性表  
 面に結合させて精製することができる。また、精製は室  
 温で好適に行うことができる。

【0013】本発明は任意のDNA精製手法で提唱され  
 ている結合バッファの代わりに水溶性有機溶媒を用い  
 て行うことができる。本明細書中で用いられる「精製」  
 とは実質的に細胞屑その他を含まないDNAを取得する  
 ことを意味する。

【0014】

【課題を解決するための手段】DNAの精製または単離  
 工程の出発時には、どの場合も所望のDNAを供給源か  
 ら取得することが必要である。血清、尿およびバクテリ  
 アのカルチャー等の試料からDNAを得る典型的な手法は  
 よく知られており、日常的方法で行うことができる。同  
 様にゲノムライブラリー等からDNAを得る技術も日常  
 的方法が知られている。

【0015】本発明は個々の供給源から得られたDNA  
 の精製に関する。本発明の実施に際してDNAの起源は  
 キーポイントではない。発明のキーポイントは供給源か  
 ら取得した後にDNAを精製する能力である。DNAを得  
 るための典型的な方法は、DNAを溶液中に懸濁させた  
 段階で終わっている。生物学的サンプルからDNAを単  
 離するための文献には次のものが含まれる：Hardi  
 ng, J. D., Gebeyehu, G., Bebe  
 e, R., Simms, D., Ktevan, L., N  
 ucleic Acids Research, 17:  
 6947 (1989) およびMarko, M. A., C  
 hipperfield, R., およびBirnbom,  
 H. C., Analytical Biochem  
 istry, 121:382 (1982)。プラスミド  
 DNAの単離方法は、Lutze, L. H., Wine  
 gar, R. A., Nucleic Acids Re  
 search 20:6150 (1990)に記載され  
 ている。生物学的サンプルからの二本鎖DNAの抽出  
 は、Yamada, O., Matsumoto, T.,  
 Nakashima, M., Hagri, S., Kam  
 ahara, T., Ueyama, H., Kishi,  
 Y., Uemura H., Kurimura, T.,

Journal of Virological Me  
 thods 27:203 (1990)に記載されてい  
 る。大部分のDNA溶液は、DNAを適当なバッファ  
 (例えばTE (トリス-EDTA)、TEAバッファ  
 (40mMトリス-酢酸, 1mM EDTA)) 中またはライ  
 イゼート中に含んでいる。

【0016】DNAを適当な溶液に取得した後、典型  
 的には結合マトリックスをこの溶液に添加する。一般に  
 用いられる結合マトリックスは、ガラスまたは珪素土  
 の形態のシリカである。

【0017】結合マトリックスをDNAの溶液に添加し  
 た後、結合バッファを添加する。本発明は、結合バッ  
 ファーとして水溶性有機溶媒を使用する。「水溶性有機  
 溶媒」とは、DNAを溶液の状態に保持することを可能  
 にする有機特性を有することを意味する。

【0018】粒子、ビーズ、その他の親水性表面を用い  
 て本発明を実施する好ましい工程は、結合工程、洗浄工  
 程、乾燥工程および溶出工程を含んでいる。結合工程は  
 一般に、DNAを含有する溶液への親水性表面の添加、  
 水溶性有機溶媒からなる溶液の添加(親水性表面および  
 水溶性有機溶媒の添加順序は重要ではない)、攪拌、遠  
 心分離、および液体画分の除去を含んでいる。結合工  
 程は、通常、少なくとも一回反復される。洗浄工程は、一  
 般に、溶媒を除去するための洗浄バッファの添加(例  
 えば50%エタノールおよび50%(40mM トリス,  
 4mM EDTA, 0.8N NaCl, pH7.  
 4))、攪拌、遠心分離、および液体の除去を含んでい  
 る。乾燥工程は、一般に、約40-70℃で約2ないし  
 20分間乾燥することよくなる。溶出工程は、一般に、  
 溶出バッファの添加(表面からDNAを遊離させるた  
 め：例えば(10mM トリス, 1mM EDTA, pH  
 8.0))、約30秒間の渦巻攪拌、約40-70℃に  
 おける約10分間の加熱、約2分間の遠心分離および液  
 体の回収を含んでいる。この時点で液体中にDNAが含  
 まれる。この溶出工程は通常少なくとも1回反復され  
 る。

【0019】本発明をフィルターのような親水性表面で  
 実施するには、好ましい工程は結合工程、洗浄工程およ  
 び溶出工程を含む。結合工程は一般に、DNAを含有す  
 る溶液への水溶性有機溶媒の添加、生じた溶液のフィル  
 ターへの通過(典型的には、プロッターのウェル、また  
 は他の任意の濾過システム(例えば、シリンジ濾過器)  
 を用いる)、および所望によりこのフィルターに水溶性  
 有機溶媒を通過させることを含んでいる。濾過の後フィル  
 ターを軽く風乾する(約1分間)。洗浄工程は、一般  
 に、フィルターへバッファを通過させること(溶媒を  
 除去するため)からなる。一般に、このフィルターを軽  
 く風乾する(約1分間)。溶出工程は一般にフィルター  
 からDNAを除去することからなる。溶液に接触したフ  
 イルターの部分を切り取って遠心管に入れる。次に、溶

出バッファー（フィルターからDNAを遊離させるため）を添加して、約40 - 60℃で約10分間加熱する。そして、DNAを含んだ液体を取り出す。

【0020】適する水溶性有機溶液には、エタノール、プロパノール、イソプロパノールおよびアセトニトリルが含まれる。本発明の実施のためには水溶性有機溶媒を種々の濃度で用いることもできる。好ましくは、溶媒は100%イソプロパノール、エタノールまたはプロパノールである。最も好ましくは、溶媒はイソプロパノールである。水溶性有機溶媒の適する濃度は、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、およびアセトニトリルの1%ないし100%溶液を包含する。好ましくは、その濃度は20%ないし80%である。最も好ましくは、この濃度は40%ないし60%である。典型的には、溶媒の濃度を種々に低下させることは水によるが、しかしながら、複数溶媒の組み合わせを用いることもできる。溶媒の好ましい組み合わせには、イソプロパノールとエタノール、イソプロパノールとプロパノール、およびプロパノールとエタノールが含まれる。

【0021】本発明の実施に用いるために適する結合マトリックスには、任意の親水性表面が含まれる。本発明の実施の使用に適する親水性表面の例には、ニトロセルロース、セライト珪そう土、シリカポリマー、グラスファイバー、珪酸マグネシウム、シリコン窒素化合物（例えばSiN<sub>4</sub>）、珪酸アルミニウム、および二酸化珪素が含まれる。親水性表面が有することのできる多くの形状も本発明における使用に適する。親水性表面の適する形状には、ビーズ、ポリマー、粒子、およびフィルター（例えば膜）が含まれる。

【0022】結合バッファー、例えばよく知られているカオトロピック剤は、その水和性のため溶液中のDNAを親水性表面に結合させると信じられる。カオトロピック剤の水和性は、水の分子とDNAとの相互作用を低下させると信じられる。そのため、DNAと親水性表面を取り囲む水の分子との相互作用が強いられ、このことが\*

\* 水素結合による親水性表面へのDNAの結合を生じさせると信じられる。

【0023】理論により拘束や制限を受けることは望まないが、本発明は水溶性有機溶媒を「結合バッファー」として用いることにより、DNA溶液の水溶液としての特性を低下させると信じられる。DNA溶液の水溶液としての特性を減じることにより、DNAと親水性表面との相互作用が強いられ、これにより固相抽出が奏されたと信じられる。これに加え、後記実施例で証明するように、本発明は親水性表面への結合を介して精製が行われ、精製は沈澱によるものではない。

【0024】本発明は、多様な供給源からおおよそ多様な形態のDNAの精製に用いることができる。精製のためのDNAの供給源には、バクテリア、バクテリオファージ、標本、植物、動物、およびその他が含まれる。DNAは多様な形態で見出され、そのような形態には一本鎖、二本鎖、環状、および直鎖状が含まれる。本発明は任意の供給源からの任意の形態のDNAについて実施することができる。

【0025】以下の実施例において、本明細書中に説明されている発明の特定の態様を説明する。当業者に明らかとなり、種々の変更および修飾が可能であり、それらは本発明の範囲内である。

#### 【0026】

##### 【実施例】

#### 【0027】

【実施例1】この実験は、6M NaClO<sub>4</sub>（プレップアジーン（prep-a-gene））に対する各結合バッファーの結合特性を比較する。すべての実験は、プレップアジーンマトリックス（Prep-a-geneキット、バイオラッド社（Bio-Rad）、リッチモンド、CA）中で行い、結合バッファーを変える以外は同じ条件で行う。

#### 【0028】

物質:

ポリエチレングリコール (PEG) フルカ(フルカケミカルコーポレーション、ロンコン、NY)

尿素 フィッシャー(フィッシャーサイエンティフィック、ノークロス、GA) 895704

KSCN シグマ(シグマケミカルカンパニー、セントルイス、Mo.) 488-0409

エタノール(EtOH) フィッシャー 902233

ブタノール(BuOH) フィッシャー 890783

グリセロール シグマ 104F-0026

塩酸グアニジン BRL 9DB209

水酸化ナトリウム(NaOH) フィッシャー 862699

LOT #

24718584 MW

| 7                                                         |                                        | 8               |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------|
| 水酸化アンモニウム<br>( $\text{NH}_4\text{OH}$ )                   | フィッシャー                                 | 860118          |
| 硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )                             | フィッシャー                                 | 860102          |
| アセトニトリル( $\text{CH}_3\text{CN}$ )                         | フィッシャー                                 | 890789          |
| 酢酸ナトリウム( $\text{NaOAc}$ )                                 | シグマ                                    | S-2889          |
|                                                           |                                        | ロット 19F-0010    |
| ブレップ ア ジーン<br>キット                                         | バイオラッド                                 | コントロール<br>41180 |
| $\lambda$ DNA<br>(503 $\mu\text{g}$ / 803 $\mu\text{l}$ ) | BRL (ベセスダリサーチ<br>ラブズ、グランドアイランド、<br>NY) | 56125A          |

【注】：13すべての結合バッファーを同じ条件で使用した。

【0029】各13サンプルに20  $\mu\text{l}$ のブレップ ア ジーン 珪素土溶液を加えて、次に750  $\mu\text{l}$ の結合バッファーを軽く渦巻攪拌し、そして5分間45°Cにおいてインキュベートし、2分間遠心分離し、上清を捨て、そして結合工程を繰り返した。500  $\mu\text{l}$ の洗浄バッファーで洗浄し、遠心分離し、バッファーを捨て、そして繰り返した。25  $\mu\text{l}$ の溶出バッファーを加えて、渦巻攪拌し、5分間50°Cにおいてインキュベートし、遠心分離し、上清を保管し、そして繰り返した。各13サンプルおよび一つのスタンダードをゲル電気泳動した。

【0030】以下の結合バッファーを使用のために示す：

- 1) ブレップ ア ジーン キットのスタンダード6M  $\text{NaClO}_4$  (過塩素酸ナトリウム)
- 2) 10% PEG
- 3) 20% PEG
- 4) 6M グリセロール
- 5) 95% エタノール
- 6) 100% ブタノール
- 7) 6M KSCN
- 8) 6M 尿素
- 9) 8M 塩酸グアニジン
- 10) 30%  $\text{NH}_4\text{OH}$
- 11) 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 12) 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$
- 13) 6M  $\text{NaOAc}$
- 14) スタンダード $\lambda$  DNA

13の溶出DNAサンプルとオリジナルDNAサンプル( $\lambda$  DNA)とを比較したゲル電気泳動の結果によれば、エタノールは固相上(ブレップ ア ジーンマトリックス)におけるDNAの保持に関して、試験された6M過塩素酸ナトリウムおよび他のどの結合バッファーよりも優れている。アセトニトリルも良好であった。

【0031】

【実施例2】この実験は、実施例1において得られた結果を拡張するものである。この実験において、エタノール

と $\text{CH}_3\text{CN}$ が良好なDNA結合バッファーであることが示された。この実験において、どの程度の%のエタノール、 $\text{CH}_3\text{CN}$ およびメタノールが結合バッファー中に存在することができ、そしてDNAの良好な分離および回収が得られるかが測定される。すべての実験はブレップ ア ジーンマトリックスを使用して実施される。

【0032】物質：

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| ブレップ ア ジーン キット         | バイオラッド |
| エタノール                  | フィッシャー |
| メタノール                  | フィッシャー |
| $\text{CH}_3\text{CN}$ | フィッシャー |

1%アガロースゲル

$\lambda$  DNA BRL 56125A, 9モル 104 503  $\mu\text{g}$  (803  $\mu\text{l}$ 中)

実験

15画分/実験が使用される結合バッファー中のみを変更して行われた。洗浄バッファー、溶出バッファーおよび固相はすべてブレップ ア ジーン キットのものであった。その方法は、実質的に実施例1に教示されたとおり実施される。1.3  $\mu\text{l}$ の $\lambda$  DNAを各画分において使用する。

【0033】画分(100%以外は水で希釈する)

- 1) 100% エタノール (水溶液)
- 2) 80% エタノール (水溶液)
- 3) 60% エタノール (水溶液)
- 4) 40% エタノール (水溶液)
- 5) 20% エタノール (水溶液)
- 6) 100% メタノール (水溶液)
- 7) 80% メタノール (水溶液)
- 8) 60% メタノール (水溶液)
- 9) 40% メタノール (水溶液)
- 10) 20% メタノール (水溶液)
- 11) 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (水溶液)
- 12) 80%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (水溶液)
- 13) 60%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (水溶液)
- 14) 40%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (水溶液)
- 15) 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (水溶液)

15の試験画分から溶出されたDNAはゲル電気泳動に

9

より分析され、そしてスタンダードDNAサンプル(48 $\mu$ lのTEバッファー(10mM トリス塩酸、1mM EDTA、pH8.0)中の1.3 $\mu$ lの $\lambda$  DNA)と比較された。その結果、100%エタノールが最良の結合バッファーであり、2番目が100%アセトニトリルであった。結合バッファーに付与されたより有機的な特性がより良好なDNAの保持をもたらす。

## 【0034】

【実施例3】この実験は、結合能力に関して、プロパノール(PrOH)、イソプロパノール(iPrOH)およびエタノール(EtOH)と、それらの互いの希釈物並びにNaClO<sub>4</sub>とを比較している。プレップアジーンマトリックスに対するDNAの結合への有機的な効果を最大にすることを目的とする。

## 【0035】物質:

プレップアジーンキット バイオラッドコントロール(キット)41492  
マトリックス 40523

$\lambda$  DNA(503 $\mu$ g/803 $\mu$ l) BRL 56125A

9モル 104

1%アガロースゲル

EtOH フィッシャー 902233

PrOH フィッシャー 744241

iPrOH アルドリッチ 06208T

W

DMSO アルドリッチ 9624HC

(ジメチルスルフォキシド)

方法: 13画分について行われた。各13画分に使用された結合バッファーを以下に示す。すべて、結合バッファー以外はプレップアジーンキット材料を用いて行われ、そして実質的には実施例1の教示によるプレップアジーン方法を用いて行われた。

## 【0036】使用された結合バッファー:

1) 100% プロパノール

DNAを保持するもの

1) iPrOH

2) EtOH

3) 6M NaClO<sub>4</sub>

4) 60% iPrOH 40% EtOH

5) 60% PrOH 40% EtOH

6) PrOH

7) A) 40% iPrOH 60% EtOH

B) 40% PrOH 60% EtOH

8) A) 80% iPrOH 20% H<sub>2</sub>O

B) 80% PrOH 20% H<sub>2</sub>O

9) A) 20% PrOH 80% EtOH

B) 20% PrOH 80% EtOH

10) 8M塩酸グアニジン

11) 6M KSCN

12) CH<sub>3</sub>CN

10

\* 2) 80% プロパノール 20% H<sub>2</sub>O

3) 100% イソプロパノール

4) 80% イソプロパノール 20% H<sub>2</sub>O

5) 100% DMSO

6) 80% DMSO 20% H<sub>2</sub>O

7) 20% プロパノール 80% エタノール

8) 40% プロパノール 60% エタノール

9) 60% プロパノール 40% エタノール

10) 20% イソプロパノール 80% エタノール

11) 40% イソプロパノール 60% エタノール

12) 60% イソプロパノール 40% エタノール

13) プレップアジーン結合バッファー 6M NaClO<sub>4</sub>

14) スタンダードDNA( $\lambda$  DNA)

溶出されたDNAをゲル電気泳動により分析し、そしてスタンダードDNAサンプルと比較した。その結果、100%イソプロパノールが最良の結合バッファーであることが示唆される。100%プロパノールも良好なDNAの保持をもたらした。イソプロパノールおよびプロパノールは水に80%に希釈することができ、DNAの保持をもたらすことができた。この試験により、エタノール中のイソプロパノールおよびプロパノールの%が増加すると共に保持するDNAの量も増加した。

【0037】多量の高分子量のDNA(電気泳動の始点にほぼ近い位置のDNA)はiPrOH(100%)を用いると保持し、これは使用された結合バッファー中で最も高かった。DMSOはDNAを保持しなかった。

【0038】以下に、結合バッファーがDNAを保持する能力に関して、スタンダードと比較して好ましいものから順にゲル電気泳動の分析に基づく結果を集約する。

## 【0039】

保持しないもの

10% PEG

20% PEG

6M グリセロール

6M 尿素

30% NH<sub>4</sub>OH

10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

6M NaOAC

MeOH 100%

または水による希釈液

100%未満のEtOH

100%未満のCH<sub>3</sub>CN

100%未満のDMSO

- 13) NaI  
 14) BuOH  
 15) 6M グアニジンHSCN  
 16) 6M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 17) 6M NaCl

## 【0040】

【実施例4】この実験は、さまざまなフィルター(膜)に対するDNAの固着能力に関して、結合バッファ- $\text{NaO}_3\text{Cl}$ と $\text{iPrOH}$ を比較している。

【0041】**物質**:ゲルマンサイエンス(Gelman Sciences, Inc.)フィルター(ゲルマンサイエンス社、アンアーバー、MI)タイプAEグラスフィルター(ロット603202)。

【0042】MSIグラスファイバーフィルター(ミクロンセパレーション(Micron Separation, Inc.))、ウエストボール、MA(ロット19571)。

【0043】ワットマンGF/B(ワットマン社(Wh \*  
 iPrOH フィッシャー

**装置**:プロッター(バイオラッド社のバイオ/ドット装  
 置)

**方法**:DNAを捕まえるのに使用される膜を各々の場合  
 に変える以外は、同じ方法により6画分を調製した。約  
 1.3 $\mu\text{l}$ の $\lambda$  DNAを約248 $\mu\text{l}$ のTEバッファ-  
 に溶解する。これを約750 $\mu\text{l}$ の $\text{iPrOH}$ で希釈  
 し、そしてフィルターを通過させることによりプロッター  
 に添加する。すべての液体が通過した後、約1分間風  
 乾する。再び約750 $\mu\text{l}$ の $\text{iPrOH}$ を添加し、約1  
 分間風乾する。すべての $\text{iPrOH}$ が通過した後、約7  
 50 $\mu\text{l}$ のブレップ ア ジーン洗浄バッファ-を添加  
 し、通過後約1分間風乾する。

【0045】ウエルのところでフィルターを切る。切っ  
 た部分を遠心チューブに入れる。50 $\mu\text{l}$ のブレップ  
 ア ジーン溶出バッファ-を添加する。約60°Cにおい  
 て約20分間加熱する。ゲル電気泳動による結果から、  
 イソプロパノールがワットマンGF/B、ワットマンG  
 F/C、MSIグラス、ゲルマンAEおよびニトロセル  
 ロースに適していることが示唆される。イソプロパノール  
 とゲルマンAEフィルターはほぼ100%のDNAを  
 保持した。

## 【0046】

【実施例5】この実験は、1) DNAの結合に対するp  
 Hの効果、2) 結合表面としてのCELITE(珪そう  
 土)の効果、および3) シラン化表面(即ち、疎水性)  
 へのDNA固着に対する $\text{iPrOH}$ の効果を測定する。

【0047】**物質**:

シラン化表面  
 ブレップ ア ジーン  
 $\text{iPrOH}$   
 1N NaOH

\* atman Ltd.)、イングランド、英国)コント  
 ロール 7823

ワットマンGF/D(コントロール 4706)

ワットマンGF/C(コントロール 1505)

$\lambda$  DNA(BRL)ロット9 mo 1104(503  
 $\mu\text{g}/803\mu\text{l}$ )

ニトロセルロース(シュライヒャー アンド シュエル  
 (Schleicher & Schuell)、キ-  
 ン、NH)44031621

ブレップ ア ジーン(バイオラッド)コントロール  
 4004。

## 【0044】

744241

1N HCl

1 $\times$  TEバッファ-中の1% アガロースゲル  
 TEバッファ-

泳動マーカ-染色液

$\lambda$  DNA

**方法**:248 $\mu\text{l}$ のTEおよび1.3 $\mu\text{l}$ の $\lambda$  DNA  
 を含む7つのサンプルを調製した。サンプル1-3には  
 3つのシラン化表面(ジーンクリーンマトリックス(バ  
 イオ101、ラ ジョラ、CA)、サークルブレップマ  
 トリックス(バイオ101)、およびブレップ ア ジ-  
 ーン マトリックス(バイオラッド)の内の1つを添加  
 し、次に750 $\mu\text{l}$ の $\text{iPrOH}$ を添加する。60°Cに  
 おいて10分間加熱する。

【0048】この間、他の3つのサンプルには20 $\mu\text{l}$   
 のブレップ ア ジーン マトリックスを添加し、4番  
 目には50%セライト545(フィッシャー)および5  
 0%TEバッファ-の溶液20 $\mu\text{l}$ を添加する。セラ  
 イトサンプルおよび他の3つのサンプルのうちの1つには  
 750 $\mu\text{l}$ のブレップ ア ジーンバッファ-を添加  
 し、1サンプルには1N水酸化ナトリウムで調整したp  
 H11.0のブレップ ア ジーンバッファ-750 $\mu\text{l}$   
 を添加する。1サンプルには1N塩酸で調整したpH  
 0.1のブレップ ア ジーンバッファ-750 $\mu\text{l}$ を  
 添加する。4つすべてを10分間60°Cにおいて加熱す  
 る。

【0049】7サンプルを遠心分離し、そして結合バッ  
 ファ-をデカントにより除く。各サンプルに対して、最  
 初に使用したのと同じ結合バッファ-750 $\mu\text{l}$ を添加  
 する。60°Cにおいて5分間加熱する。遠心分離し、そ  
 して結合バッファ-をデカントにより除く。各サンプル  
 に対して500 $\mu\text{l}$ のブレップ ア ジーン洗浄バッフ



アーを添加し、5分間攪拌/振盪し、遠心分離し、デカントし、60℃において10分間乾燥する。25μlのプレッパージーン溶出バッファーを添加し、60℃において10分間加熱し、遠心分離し、バッファーを集め、溶出段階を繰り返す。

【0050】溶出された画分をゲル電気泳動により分析し、そしてスタンダードDNAサンプルと比較した。その結果、シラン化表面からはDNAが回収されず、即ち、前の実験においてDNAは表面に結合せず、沈殿しなかったことが証明された(沈殿物は表面に結合せず、そして洗浄段階で洗浄された)。

【0051】

【実施例6】この実験は、ニトロセルロース膜に対するDNAの結合能力に関して、結合バッファーを比較する。

【0052】**出発物質:**

洗浄バッファー(50%EtOH 50%(40mMトリス、4mMEDTA、6MNaCl、pH7.4))

結合バッファー(50mMトリス、1mMEDTA、6MNaClO<sub>4</sub>、pH7.5)

溶出バッファー(10mMトリス、1mMEDTA、pH8.0)

ニトロセルロース(5.0μM AE98 オーダー #19020 ロット643317 S&S)

ニトロセルロース(0.45μm BA85 ロット #9039/7 S&S)

1×TAE(1×=89mMトリス-ホウ酸、2mMEDTA、89mMホウ酸)中の1%アガロースゲル泳動マーカー染色液

TEバッファー

iPrOH

EtOH

KSCN

8M塩酸グアニジン

TBSバッファー

NaClO<sub>4</sub>

プレッパージーンキット

方法: 7つの同一サンプル(248μlのTEバッファーおよび1.3μlのλDNA)を調製した。各工程で結合バッファーを変える以外は実施例4と正確に同じ方法で、プロッターを使用して7サンプルをニトロセルロース膜に結合させる。

【0053】DNA溶液を750μlの結合バッファーに添加し、次にウエルに添加する。液体を通過させ、1分間風乾する。ウエルにそれぞれの結合バッファー750μlを添加し、液体の通過後1分間風乾する。750μlの洗浄バッファーで洗浄する。液体の通過後1分間風乾する。

【0054】各ウエルを以下のように丸く切り、遠心チ

ューブに入れる。溶出バッファー50μlを添加し、60℃において10分間加熱する。

【0055】溶出されたDNAサンプルをゲル電気泳動により分析し、そしてスタンダードDNAサンプルと比較する。この結果から、イソプロパノール、プロパノール、およびエタノールがDNAを保持したが、カオトロブによるDNAの保持は顕著に少ないことが示唆される。

【0056】

10 【実施例7】この実験の目的は、クラミジア(**Chlamydia**)溶解物に加えたλDNAが、イソプロパノールを結合バッファーとして用いた場合に珪そう土に結合するか否かを測定するものである。

【0057】**物質:**

イソプロパノール(アルドリッチ、ミルウオーキー、W102610MW)

プレッパージーンキット(バイオラッド 41640)

λDNA-(BRL 503μg/803μl)

20 クラミジア(-)溶解物

ウエイカントリーヘルス部門(Wake County Health Dept.)のクラミジア(-)溶解物

TEバッファー(10mMトリス塩酸、1mMEDTA、pH8)

TAEバッファー(1×)

エチジウムブロマイド(10mg/1mlストック(シグマ Cat #E-875 ロット #97E-3722))

30 1×TAEバッファー中の4%ヌシーブ(NuSieve)アガロース

φX174 RF DNAのHaeIII分解物(BRL Cat #5611SA ロット #940103)

λDNAのHindIII分解物(BRL Cat #5612SA ロット #940104)

タイプII電気泳動マーカー染色液(25%フィコル、0.25%ブロムフェノールブルー、0.25%キシレンシアノール)

40 電気泳動ユニット: BRL ホライズン 58

サブマリンユニット

パワーユニット: ファルマシア タイプ EPS 500/400

写真装置: ポラロイド タイプ 50ランドカメラ

ポラロイド タイプ 57フィルム

フォトダイン ライト ボックス UV

その他: シリコン化された滅菌マイクロ遠心チューブ

ゲル/ローディングピペット チップス(ストラタジーン、ラジヨラ、CA)

50 サンプル、調製および方法: それぞれ250μlのクラ

ミジア (-) ヒト サンプルを含む 13 サンプルを調製する。各サンプルに  $\lambda$  DNA の 1 : 10 希釈液を 10  $\mu$  l ずつ添加する。14 番目のサンプルは水 250  $\mu$  l および  $\lambda$  DNA の 1 : 10 希釈液 10  $\mu$  l を含み、クラミジア (-) ヒト サンプルを含まないように調製される。

【0058】サンプルのうちの 5 つとスタンダードには、20  $\mu$  l のプレップ ア ジーンローディング マトリックスを添加し、次に 750  $\mu$  l のイソプロパノールを添加して室温で 10 分間攪拌する。他の 8 サンプルには最初にイソプロパノールを添加し、次に結合マトリックスを添加して攪拌する。後の実験は 13 サンプルすべてとスタンダードについて全く同様に実施した。

【0059】サンプルを室温で 10 分間攪拌後、1 分間遠心分離し、デカントし、そして上清を捨てる。750  $\mu$  l のイソプロパノールで洗浄し、室温で 10 分間攪拌し、遠心分離し、デカントし、そして上清を捨てる。50°C で 10 分間加熱して結合マトリックスを乾燥させる。25  $\mu$  l のプレップ ア ジーン溶出バッファーを添加する。50°C で 10 分間加熱し、1.5 分間遠心分離する。上清を集めて、各 14 サンプルから得られた溶出画分を混ぜて溶出段階を繰り返すことにより、14 の (50  $\mu$  l) 溶出 DNA サンプルが得られる。これらの

溶出サンプルをゲル電気泳動により分析することにより、どの DNA が溶出されたかを測定する。

【0060】この実験から、DNA は細胞残渣 (即ち、炭素化合物、蛋白質、核酸、等々) を含むサンプルから取得できることが証明される。コントロールの  $\lambda$  DNA とヒト DNA は共にサンプルから取得される。また、この実験から、多くの異なるプロトコルはイソプロパノールを結合バッファーとして使用することができ、そしてサンプルから高いパーセンテージで DNA を取得することも証明される (例えば、結合段階において加熱を行うか否か、2 つの結合段階が使用できるか 1 つの結合段階が使用できるか、洗浄段階は 50 % エタノールおよび 50 % の低濃度の EDTA、pH 8.0 バッファーを使用できるかまたは洗浄しないかである。試薬の添加順序は重要でなく、言い換えれば、結合バッファーまたは結合マトリックスを最初に添加しても各サンプルから回収される DNA の量に顕著な差はない。 )。

【0061】本発明は特定の修飾に関して記述されているが、それらの詳細は限定のための構成ではなく、本発明の趣旨および目的から離れる事なく、さまざまな等価物、変化および修飾を加えてもよく、そしてそのような等価物が本明細書に含まれることが理解される。